

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Iva Benešová**

Proapoptotické a antiapoptotické vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk

Pro-apoptotic and anti-apoptotic properties of mesenchymal stem cells

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce/Školitel: Mgr. Jan Kössl

Praha, 2019

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

### **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Janu Kösslovi za odborné rady, ochotu mi zodpovědět všechny mé dotazy a věnovaný čas. Dále děkuji panu prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc. za cenné rady při psaní této bakalářské práce.

# Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam zkratek .....	8
Úvod.....	11
Cíle bakalářské práce .....	11
1. Kmenové buňky .....	12
1.1 Embryonální kmenové buňky .....	12
1.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky.....	13
1.3 Dospělé kmenové buňky .....	13
1.3.1 Hematopoetické kmenové buňky .....	14
1.3.2 Neurální kmenové buňky .....	14
1.3.3 Mezenchymální kmenové buňky .....	14
<i>1.3.3.1 Imunomodulační vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk.....</i>	<i>16</i>
2. Apoptóza.....	18
2.1 Vnitřní cesta apoptózy .....	18
2.2 Vnější cesta apoptózy .....	19
2.2.1 <i>FasL</i> .....	20
2.2.2 <i>Apoptózu indukující ligand asociovaný s faktorem způsobující nekrózu nádorů</i> .....	20
2.2.3 <i>Faktor způsobující nekrózu nádorů</i> .....	20
2.2.4 <i>Ligand programované buněčné smrti 1</i> .....	21
2.3 Rozdíl mezi apoptózou a nekrózou .....	21
3. MSC a apoptóza.....	22
3.1 Ochrana MSC před apoptózou.....	22
3.2 Modulace apoptózy pomocí MSC.....	23
3.2.1 Indukce apoptózy .....	23
3.2.1.1 Indukce apoptózy u nádorových buněk .....	23

3.2.1.1.1 <i>TRAIL</i> .....	23
3.2.1.1.2 <i>Další způsoby indukce apoptózy nádorových buněk</i> .....	24
3.2.1.2 Indukce apoptózy u buněk imunitního systému .....	25
3.2.2 Inhibice apoptózy .....	26
3.2.2.1 Inhibice apoptózy u nádorových buněk .....	26
3.2.2.2 Inhibice apoptózy u imunitních buněk .....	27
3.2.2.2.1 <i>Neutrofily</i> .....	27
3.2.2.2.2 <i>B lymfocyty</i> .....	28
3.2.2.2.3 <i>T lymfocyty</i> .....	28
3.2.2.2.4 <i>Další buňky</i> .....	29
Závěr .....	30
Seznam citací .....	32
Seznam internetových zdrojů .....	40

## Abstrakt

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSC) různými mechanismy ovlivňují nejen okolní buňky, ale i fungování celého organismu. Vedle dobře známých imunomodulačních vlastností jsou MSC schopny za různých podmínek vyvolat apoptózu nebo jí zabránit, a to jak u nádorových, tak i imunitních buněk. Antiapoptotickými účinky jsou schopny ochránit i další typy buněk. Není pravidlem, že ochrana před apoptózou má vždy pozitivní efekt a naopak. Přesné porozumění účinků MSC na apoptózu by přineslo výrazný pokrok v potenciální aplikaci MSC a usnadnění léčby u velké řady onemocnění. MSC jsou vystavovány oxidativnímu stresu, hypoxii a prostředí s velkým množstvím proapoptických faktorů, což zapříčiňuje jejich senescenci a apoptózu. Nebýt ale tohoto prostředí, nedošlo by k aktivaci všech vlastností MSC. V současné době je veden intenzivní výzkum k prodloužení přežívání MSC, neboť by tím došlo i ke zlepšení případné biologické léčby.

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky, apoptóza, biologická léčba

## **Abstract**

Mesenchymal stem cells (MSC) display different ways of influencing not only surrounding cells but also the function of the whole organism. Besides well known immunomodulatory properties, MSC are capable of inducing and inhibiting of apoptosis in various conditions, effecting mostly cancer and immune cells. They are able to protect other cell types against apoptosis. On the contrary, anti-apoptotic and apoptotic effect of MSC is not always beneficial. Deeper and more precise understanding of influence of MSC on the apoptosis is needed to allow the usage of MSC in the biological therapy and to facilitate the treatment of many diseases. MSC are exhibited to oxidative stress, hypoxia and many pro-apoptotic factors, which cause their senescence and apoptosis. However, without this microenvironment they will not be activated and will not gain all their properties. Nowadays is an intensive research in prolongation of MSC's lifespan done, because it would improve potential biological therapy.

Key words: mesenchymal stem cells, apoptosis, biological therapy

## Seznam zkratek

<b>AD-MSC</b>	adipose-derived mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně
<b>AICD</b>	activation-induced cell death, aktivací indukovaná buněčná smrt
<b>Bad</b>	B cell lymphoma 2 associated death promotor, B buněčný lymfom 2 asociovaný promotor smrti
<b>Bak</b>	B cell lymphoma 2 homologous antagonist killer, B buněčný lymfom 2 homologní antagonist zabíječ
<b>Bax</b>	B cell lymphoma 2 associated X, X protein asociovaný s buněčným lymfomem
<b>Bcl-2</b>	B cell lymphoma 2, B buněčný lymfom 2
<b>Bcl-xL</b>	B cell lymphoma – extra large, B buněčný lymfom – xL
<b>Bid</b>	BH3 interacting domain death agonist, agonista smrti interagující s BH3
<b>CKD2</b>	cykline D2, cyklin D2
<b>Cyt c</b>	cytochrome c, cytochrom c
<b>DC</b>	dendritic cells, dendritické buňky
<b>DISC</b>	death-inducing signaling complex, signální komplex indukující smrt
<b>DR</b>	death receptor, receptor smrti
<b>DTH</b>	delayed type hypersensitivity, hypersenzitivita oddáleného typu
<b>ESC</b>	embryonal stem cells, embryonální kmenové buňky
<b>FADD</b>	Fas-associated via death domain, doména smrti asociovaná s Fas
<b>HSC</b>	hematopoietic stem cells, hematopoetické kmenové buňky
<b>IDO</b>	indolamin 2,3-dioxygenase, indolamin 2,3 dioxygenáza
<b>iNOS</b>	inducible nitric oxid synthase, inducibilní syntáza oxidu dusnatého
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$



<b>iPSC</b>	induced pluripotent stem cells, indukované pluripotentní kmenové buňky
<b>MSC</b>	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
<b>NSC</b>	neural stem cells, neurální kmenové buňky
<b>Nrf-2</b>	nuclear factor (erythroid-derived 2) – related factor 2, nukleární faktor odvozený z erythroidů 2
<b>ROS</b>	oxygen reactive species, reaktivní formy kyslíku
<b>SLE</b>	systemic lupus erythematosus, systémový lupus erythematosus
<b>SOD</b>	superoxide dismutase, superoxid dismutáza
<b>Tconv</b>	conventional T lymphocyte, konvenční T lymfocyt
<b>TGF <math>\beta</math></b>	transforming growth factor $\beta$ , transformující růstový faktor $\beta$
<b>TRAIL</b>	tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, doména smrti asociovaná s receptorem faktoru způsobující nekrózu nádorů (sTRAIL: solubile, solubilní, memTRAIL: membrane, membránový)
<b>TRADD</b>	tumor necrosis factor receptor associated death domain, receptorem nádorového faktoru asociovanou doménou smrti
<b>Treg</b>	regulatory T lymphocyte, regulační T lymfocyt
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor $\alpha$ , faktor způsobující nekrózu nádorů $\alpha$
<b>TNFR-1</b>	tumor necrosis factor receptor 1, receptor faktoru způsobující nekrózu nádorů
<b>UC-MSC</b>	umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky získané z pupečnickové krve
<b>PD-1</b>	programmed death 1, programovaná smrt 1
<b>PD-L1</b>	programmed death ligand 1, ligand programované buněčné smrti 1
<b>PD-L2</b>	programmed death ligand 2, ligand programované buněčné smrti 2
<b>PTX</b>	paclitaxel

<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor, růstový faktor cévního endotelu
<b>XIAP</b>	X linked inhibitor of apoptosis protein, X vázaný inhibitor apoptotického proteinu

## Úvod

Pro kmenové buňky je typická neustálá schopnost sebeobnovy a diferenciaci do jiných buněčných typů. Dle jejich schopnosti diferenciaci se dále dělí na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. V závislosti na jejich vlastnostech jsou děleny na embryonální kmenové buňky (embryonal stem cells, ECS), indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells, iPSC) a dospělé kmenové buňky, mezi které řadíme hematopoetické kmenové buňky (hematopoietic stem cells, HSC), neurální kmenové buňky (neural stem cells, NSC) a v neposlední řadě také mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSC), které se vyskytují téměř ve všech typech tkání, kde napomáhají při regeneraci. MSC mají přirozenou schopnost migrace do místa zánětu, poranění nebo nádorového prostředí. Jsou hojně studovány kvůli jejich produkci velkého množství regulačních molekul, především imunomodulačního charakteru. Z tohoto důvodu se jeví jako slibný prostředek k léčbě mnohých onemocnění.

Apoptóza, také nazývána programovaná buněčná smrt, je přirozený proces udržující homeostázi organismu. Mnoho buněk apoptoticky umírá při vývoji jedince. Tento proces je také důležitý v odstranění poškozených buněk. Procesem apoptózy se dá například zabránit šíření virových infekcí či nádorového bujení.

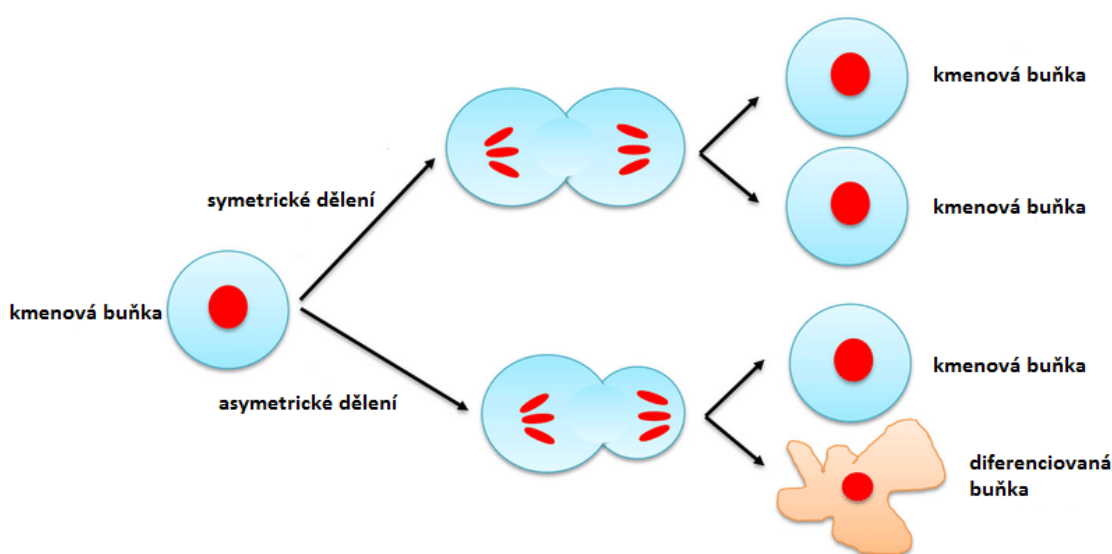
MSC jsou schopny indukovat i inhibovat apoptózu. Tímto způsobem se dají ovlivňovat procesy v organismu. Regulace apoptózy se jeví jako slibná biologická léčba některých nádorových a autoimunitních onemocnění. Při použití MSC v léčbě pacienta by se však měla věnovat zvýšená pozornost dalším vlastnostem MSC a především efektu prostředí, do kterého jsou buňky vneseny.

## Cíle bakalářské práce

- shrnutí současných poznatků a apoptotických a antiapoptotických vlastnostech MSC na různé typy buněk
- porovnání efektu prostředí na vlastnosti MSC

# 1. Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou definovány jako buňky schopné neustálé sebeobnovy a schopnosti diferenciaci do různých typů buněk. Tato sebeobnova je zajištěna pomocí asymetrického dělení, kdy z jedné kmenové buňky vzniká nová kmenová buňka a buňka dceřiná, která dále diferencuje ve specializovaný buněčný typ. Kmenové buňky si zachovávají schopnost symetrického buněčného dělení (Obr. 1), což je považováno za jedno z kritérií úspěšné kultivace kmenových buněk (Chen et al., 2015). K asymetrickému dělení kmenových buněk dochází až po určitém stimulu (Xu et al., 2018). Kmenové buňky se podílí především na vývoji nového jedince a reparaci tkání, čímž udržují homeostázi (Medvinsky and Livesey, 2015).



**Obr. 1 Rozdíl mezi symetrickým a asymetrickým buněčným dělením** (upraveno podle: Chen et al., 2015)

## 1.1 Embryonální kmenové buňky

ESC se získávají u savců z blastocysty. Blastocysta se dělí na tenkou zevní vrstvu trofoblast a uvnitř nacházející se embryoblast. Ten je tvořený pluripotentními embryonálními buňkami, které jsou schopny diferencovat v jakýkoliv buněčný typ, včetně trofoblastu. Nejsou však schopny sebeorganizace vedoucí ke vzniku celého organismu (Young, 2011). K identifikaci pluripotence se používá triáda genů: *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*, které působí jako regulační faktory modifikující prostředí a genovou expresi v buňce (Niwa, 2007). ESC mají potenciál v buněčné terapii, transplantační biologii, tkáňovém inženýrství nebo se dají využít ve vývojové biologii. Jejich výzkum i používání je ale značně omezen etickými zásadami a nebezpečím tvorby teratomů (Hentze et al., 2009).

## 1.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Jedná se o buňky, které původně pluripotentní vlastnosti neměly a byly u nich uměle navozeny. K získání iPSC je potřeba exprese regulačních faktorů, po svém objeviteli pojmenovaných, tzv. Yamanaka faktorů: Oct3/4, Sox2, cMyc a Klf4 (Takahashi and Yamanaka, 2006), čehož se dá docílit vnesením těchto faktorů do buňky např. pomocí virového vektoru nebo plazmidu (Chen et al., 2015; Geis et al., 2017). V rané fázi reprogramace dochází k odstranění liniového vzorce buňky, v pozdější fázi dochází k endogenní transkripci pluripotentních genů (Sugiyama-Nakagiri et al., 2016). Výhodou iPSC je, že jejich použití není omezeno etickými zásadami a dají se využít jako alternativa ESC, problematická je opět schopnost tvorby nádorů. Yamanaka faktory bývají často asociovány s nádorovými onemocněními. Dalším problémem je vnášení genů do somatických buněk. Virové vektory, které byly původně používány, představují náhodný zásah do genetické informace a z tohoto důvodu jsou vyvíjeny nové metody přenosu (Medvedev et al., 2010).

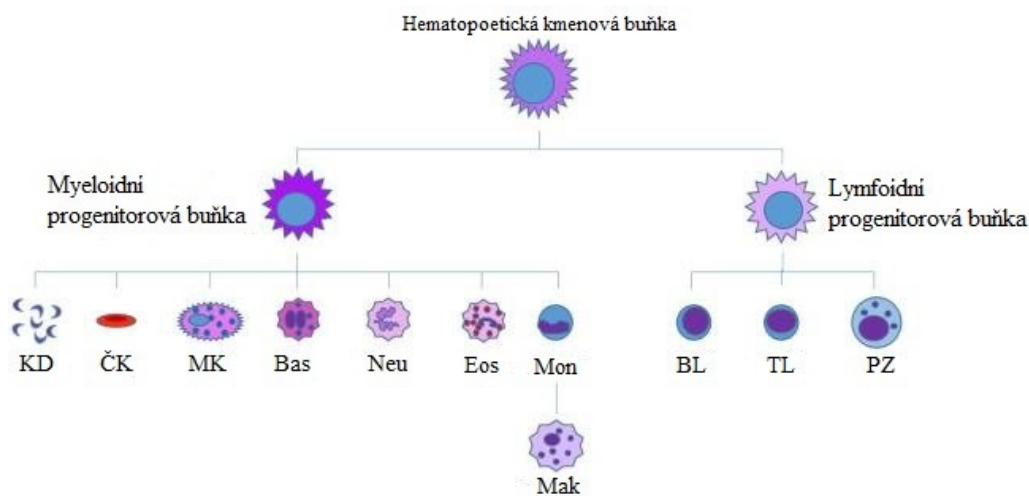
V současnosti jsou iPSC využívány k modelování různých onemocnění a buněčné terapii. V modelech se zkoumá etiologie onemocnění, tím, že dochází k reprogramaci iPSC na postižený buněčný typ. Tento přístup je využíván například u Parkinsonovy choroby. Buněčná terapie je usnadněna genetickou identitou buněk, a proto se při přenosu buněk nepoužívají imunosupresiva. Cílem buněčné terapie jsou monogenní choroby, jako je například srpkovitá anémie (Hochedlinger and Jaenisch, 2015).

## 1.3 Dospělé kmenové buňky

Dospělé kmenové buňky se nacházejí v tkáních nebo orgánech mezi diferenciovanými buňkami. Jedná se o tkáňově specifické multipotentní buňky, jejichž hlavní úlohou je udržování homeostáze a regenerace tkání, ve kterých se nacházejí. Mezi nejznámější populace dospělých kmenových buněk patří HSC, NSC a MSC.

### 1.3.1 Hematopoetické kmenové buňky

Tyto buňky se nacházejí především v kostní dřeni a produkují myeloidní a lymfoidní progenitory (Obr. 2).



**Obr. 2 Hematopoéza:** vznik diferenciováných buněk krevní řady z hematopoetické kmenové buňky, KD: krevní destička, ČK: červená krvinka, MK: megakaryocyt, Bas: basofil, Neu: neutrofil, Eos: eozinofil, Mon: monocyt, Mak: makrofág, BL: B Lymfocyt, TL: T lymfocyt, PZ: přirozený zabíječ (upraveno podle: Bradshaw et al., 2016)

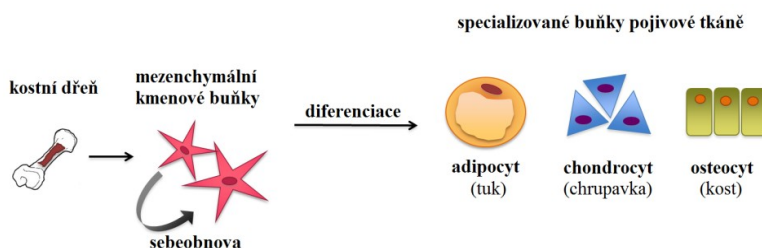
### 1.3.2 Neurální kmenové buňky

NSC mají schopnost diferencovat do neuronů (Li et al., 2016), astrocytů a oligodendrocytů (Suh et al., 2007). Známymi zdroji NSC jsou subgranulární zóna *gyrus dentate* v hippocampu a subventrikulární zóna laterálních mozkových komor. V obou oblastech dochází k produkci neuronů, které dozrávají procesem neurogeneze a zapojují se do fungování nervové soustavy (Landgren and Curtis, 2011).

### 1.3.3 Mezenchymální kmenové buňky

Tyto multipotentní kmenové buňky se nacházejí téměř ve všech tkáních dospělého organismu. Nejčastěji jsou získávány z kostní dřeni a tukové tkáně, v poslední době i z pupečnickové krve (Beeravolu et al., 2017). MSC mají schopnost diferencovat do různých buněčných typů, jako jsou osteoblasty,

chondrocyty a adipocyty (Obr. 3). Některé studie ukazují, že lze u MSC vyvolat diferenciaci i v jiné buněčné typy, jako jsou například neurony (Alizadeh et al., 2019) nebo v kardiomyocytech podobné buňky (Szaraz et al., 2017).



**Obr. 3 Symetrické a asymetrické dělení MSC kostní dřeně** (upraveno podle: [www.eurostemcell.org](http://www.eurostemcell.org))

Dominici et al. (2006) stanovili kritéria pro charakterizaci MSC. Jedním z nich je schopnost diferencovat do buněčných typů *in vitro* (Obr. 4). Dalším kritériem je schopnost adheze buněk k plastovému povrchu za standardních podmínek a posledním exprese povrchových znaků: CD73, CD90, CD105 a nepřítomnost povrchových molekul: CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a a HLA II. třídy (Tab. 1).

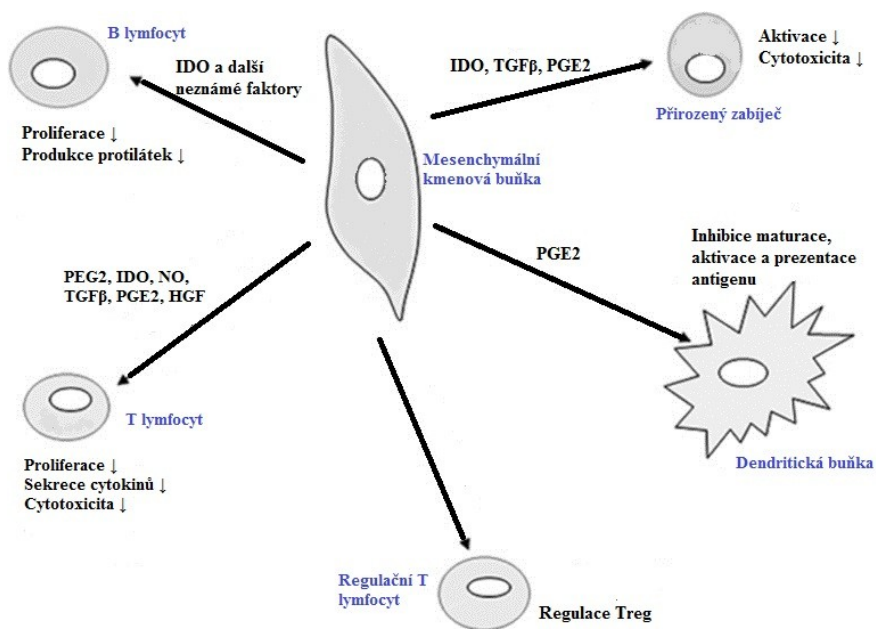
Přítomné povrchové znaky	Biologická funkce
CD73/5' nukleotidáza	Tvorba adenosinu z AMP (Reinhardt et al., 2017)
CD90/Thy-1	Kontakt buňky s matrix, mezibuněčný kontakt, migrace, apoptóza ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7070">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7070</a> )
CD105/endoglin	Součástí TGFβ receptorového komplexu (Cheifetz et al., 1992), významná role v angiogenezi (Paauwe et al., 2016)
Nepřítomné povrchové znaky	Výskyt na buňkách
CD11b	Monocyty, granulocyty, NK buňky, subpopulace B a T buněk
CD14	Monocyty, granulocyty
CD19	B lymfocyty
CD34	Progenitorové buňky, endoteliální buňky
CD45	Leukocyty
CD79a	B lymfocyty
MHC II. třídy	APC

**Tab. 1 Povrchové molekuly MSC a jejich biologická funkce, výskyt znaků, které nejsou přítomny na MSC, (zdroj: Základy imunologie, 5. vydání)**

K identifikaci, ověření a charakterizaci MSC se používají tyto metody: průtoková cytometrie, imunofluorescence, western blot, real-time PCR, protein array a indukce diferenciac. MSC mají schopnost migrovat do nádorového prostředí (Kidd et al., 2009), do místa zánětu (Teo et al., 2012) a do místa poškození (Deng et al., 2017). K tomu využívají diapedézu přes buňky epitelu skrz selektin a integrin závislou vazbu (Rüster et al., 2006).

### 1.3.3.1 Imunomodulační vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk

Imunomodulační vlastnosti MSC jsou mediovány jak solubilními faktory, tak kontaktem buňky s buňkou. Jedná se o velké množství produktů, které nejrůznějšími způsoby ovlivňují imunitní buňky (Obr. 3). Jejich působení bývá silně ovlivněno mikroprostředím, ve kterém se nacházejí. Dále také záleží na typu tkáně, ze které MSC pocházejí. Lidské MSC v přítomnosti IFN- $\gamma$  produkují solubilní indolamin 2,3 dioxygenázu (IDO), která mění tryptofan na kynurenin, čímž způsobuje hladovění buněk, které jsou utlumeny a následně hynou apoptózou (Munn and Mellor, 2013). V přítomnosti IFN- $\gamma$  dochází také k produkci růstového faktoru hepatocytů a transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ) (Ryan et al., 2007). Na utlumení proliferace T lymfocytů se podílí hemoxygenáza, která degraduje hem (Chabannes et al., 2007). Prostaglandin E2 je syntetizován cyklooxygenázou 1 a 2 a má inhibiční účinky, nejen na T lymfocyty, ale i na přirozené zabijáče a dendritické buňky (DC) (Cui et al., 2007).



Obr. 2 Imunoregulační vlastnosti MSC (upraveno podle Gao et al., 2016)



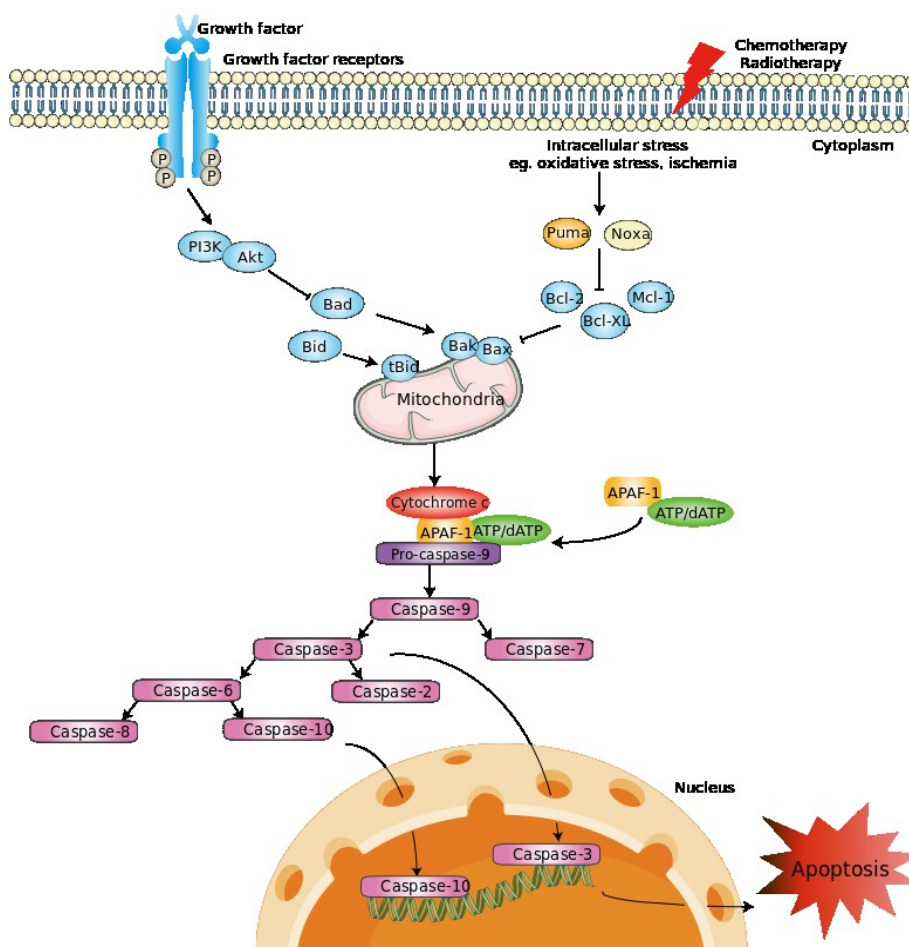
Častý způsob utlumení T lymfocytů je jejich nevratné zastavení buněčného cyklu, nejčastěji v  $G_0/G_1$  fázi, což je dáno inhibicí cyklinu D2 (CKD2), dále je zvýšen univerzální cyklin dependentní kinázový inhibitor p27Kip1, který tlumí T lymfocyty i v ostatních fázích buněčného cyklu. Studie varuje, před použitím MSC u pacientů s nádorovými onemocněními z důvodu výrazného potlačení funkcí a zastavení cyklu T lymfocytů (Glennie et al., 2005). MSC dále sekretují protizánětlivý IL-10 (Ryan et al., 2007). K potlačení B lymfocytů může docházet přímo, například jejich zastavením buněčného cyklu (Tabera et al., 2008) nebo potlačením produkce protilátek (Park et al., 2015). Jedna možnost je nepřímo inhibicí T lymfocytů a tedy nedostatečnou stimulací B lymfocytů, čímž dochází ke snížení produkce protilátek (Rosado et al., 2015). MSC mají schopnost modulovat funkce regulačních B a T lymfocytů (Treg), například u pacientů se systémovým lupusem erythematoses (SLE) došlo k jejich navýšení po vnesení MSC v myším modelu (Park et al., 2015). Další schopností MSC je potlačení diferenciace DC z monocyty, neschopnost DC aktivovat  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T lymfocyty (Chiesa et al., 2011). U přirozených zabíječů MSC snižují především cytotoxicitu a proliferaci (Sotiropoulou et al., 2006).

## 2. Apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je vysoce konzervovaný přirozený proces udržující homeostázi, podílí se na vývoji organismu nebo je součástí imunitních reakcí. Je dělena na vnitřní a vnější cestu s tím, že se tyto cesty liší v iniciaci. Fáze exekuce a fagocytózy jsou stejné.

### 2.1 Vnitřní cesta apoptózy

Jedná se o vnitrobuněčnou indukci programované buněčné smrti skrz nereceptorové signály, které vedou k narušení mitochondriální membrány a smrti buňky (Obr. 4). Buňky mnohobuněčných organismů vyžadují faktory nutné k přežití. Pokud jich je nedostatek, buňka podstoupí apoptózu. Dalšími důvody indukce apoptózy může být buněčný stres, ozáření, poškození DNA nebo přítomnost toxinů.

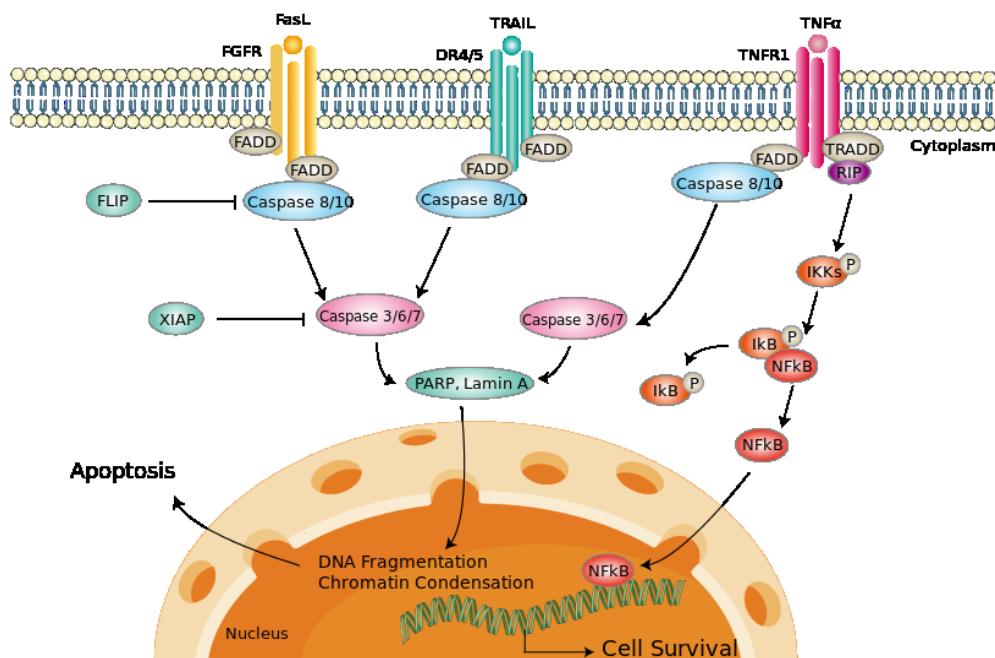


Obr. 3 Vnitřní cesta iniciace apoptózy (převzato z [www.creative-diagnostics.com](http://www.creative-diagnostics.com))

V případě nedostatku růstových faktorů dochází pomocí defosforylace k uvolnění proteinu B buněčného lymfomu 2 asociovaného promotoru smrti (B cell lymphoma 2 associated death promotor, Bad), který je za normálních okolností blokován PI3K/Akt. Defosforylovaný Bad se váže na B buněčný lymfom 2 (B cell lymphoma 2, Bcl-2) a B buněčný lymfom-xL (B cell lymphoma – extra large, Bcl-xL), a tak nedochází k vazbě Bcl-2 a proapoptických proteinů X proteinu asociovaného s B buněčného lymfomu 2 (B cell lymphoma 2 associated X, Bax) a B buněčného lymfomu 2 homologního antagonisty zabíječe (B cell lymphoma 2 homologous antagonist killer, Bak). Bak a Bax společně utvoří pór do vnější mitochondriální membrány a dojde k vylití cytochromu c z mezimembránového prostoru. Cytochrom c se váže na apoptotickou proteázu aktivující faktor 1 za vzniku apoptosomu, který aktivuje kaspázu 9. Ta aktivuje efektorové kaspázy, především kaspázu 3 (Loreto et al., 2014).

## 2.2 Vnější cesta apoptózy

Vnější cesta apoptózy je aktivována přes receptor smrti (death receptor, DR). Mezi nejznámější ligandy s receptory patří TNF- $\alpha$ /TNFR1, FasL/FasR, TRAIL/DR4, TRAIL/DR5, PDL-1/PD-1 (Obr. 5).



**Obr. 4 Vnější cesta iniciace apoptózy** (převzato z [www.creative-diagnostics.com](http://www.creative-diagnostics.com))

### **2.2.1 *FasL***

Mezi hlavní modulační složky T lymfocytů patří aktivací indukovaná buněčná smrt (activation-induced cell death, AICD), která je regulována přes FasL/FasR. Ten je také součástí jednoho z nejdůležitějších efektorových mechanismů CD8<sup>+</sup> cytotoxických T lymfocytů. FasL je součástí cytotoxických mechanismů i CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Malyshkina et al., 2017) a CD8<sup>+</sup> Treg, které tímto způsobem inhibují CD4<sup>+</sup> T lymfocyty (Liu et al., 2017). Vazba FasL na FasR vede k trimerizaci receptoru, který aktivuje doménu smrti asociovanou s Fas (Fas-associated via death domain, FADD), která je navázaná na FasR pomocí domény smrti. FADD a FasR společně tvoří signální komplex indukující smrt (death-inducing signaling complex, DISC), který skrz efektorovou doménu smrti aktivuje kaspázy 8/10 (Waring and Müllbacher, 1999). Kaspáza 8 mimo jiné štěpí agonistu smrti interagujícího s BH3 (BH3 interacting domain death agonist, Bid). Jeho fragment, tBid se váže do vnější mitochondriální membrány a způsobuje vylití cytochromu c a následuje děj jako při vnitřní cestě apoptózy (Li et al., 1998).

### **2.2.2 *Apoptózu indukující ligand asociovaný s faktorem způsobující nekrózu nádorů***

Apoptózu indukující ligand asociovaný s faktorem způsobující nekrózu nádorů (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) je protein vyskytující se ve dvou formách, membránově vázaný a solubilní. Po stimulaci mitogeny je exprimován B a T lymfocyty, makrofágy a monocyty (Ehrlich et al., 2003; Halaas et al., 2000). Indukce interferonem  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) vyvolává expresi u přirozených zabíječů, u nichž je TRAIL jeden z nejdůležitějších efektorových mechanismů, dále se po indukci vyskytuje u DC a monocytů (Fanger et al., 1999; Griffith et al., 1999; Sheard et al., 2013). Mechanismus signalizace je stejný jako u výše popsaného FasL, s výjimkou toho, že spolu interaguje TRAIL a receptor smrti 4 (death receptor 4, DR4) a receptor smrti 5 (death receptor 5) (Falschlehner et al., 2009).

### **2.2.3 *Faktor způsobující nekrózu nádorů***

Faktor způsobující nekrózu nádorů  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) je prozánětlivý cytokin produkovaný aktivovanými makrofágy a monocyty. Receptor faktoru nádorové nekrózy 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR-1) po vazbě ligandu trimerizuje. TNFR-1 je asociovaný přes doménu smrti asociovanou s receptorem faktoru způsobující nekrózu nádorů (tumor necrosis factor receptor associated death domain, TRADD), která přes receptor interagující protein indukuje dráhu aktivace nukleárního faktoru B. TRADD také aktivuje FADD, který stejným mechanismem jako výše aktivuje kaspázy 8/10 (Pobezinskaya and Liu, 2012).

Fáze exekuce apoptózy je pro obě cesty společná, dochází k aktivaci efektorových kaspáz, především kaspázy 3 pomocí kaspáz 8, 9 a 10. Kaspáza 3 aktivuje kaspázou aktivovanou DNázu, která fragmentuje DNA v jádře. Dále dochází ke vzniku apoptotických tělísek. Tato tělíska jsou v posledním kroku apoptózy fagocytována (Elmore, 2007).

#### ***2.2.4 Ligand programované buněčné smrti 1***

Dalším způsobem vyvolání apoptózy je vazba ligandu programované buněčné smrti 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) na programovanou smrt 1 (programmed death 1, PD-1). PD-1 je exprimován na povrchu T lymfocytů, u kterých slouží jako jeden z hlavních regulátorů jejich aktivity (Kinter et al., 2008). PD-L1 je exprimován na povrchu buněk nejen B a T lymfocytů, myeloidních buněk, nádorových buněk, ale i buněk epitelové tkáně, například epitelu jater (Hutchins et al., 2013). Exprese PD-L1 následuje po stimulaci daných buněk. Po vazbě PD-L1 na PD-1 dochází přes signalizační kaskádu k aktivaci fosfatázy 2 obsahující doménu homologní se Src 2, inhibici PI3K/Akt dráhy a blokaci Bcl-xl, čímž dochází k indukci apoptózy (Parry et al., 2005). K PD-1 se váže také ligand programované buněčné smrti 2 (programmed death ligand 2, PD-L2). PD-L2 je exprimován v mnohem menším množství především na makrofázích a DC. Nevede k indukci apoptózy (Latchman et al., 2001).

### **2.3 Rozdíl mezi apoptózou a nekrózou**

Na rozdíl od apoptózy je nekróza patologický proces, způsobený externími faktory jako např. toxiny nebo infekce. Nekróza vede k zánětu skrz buněčný edém a následné prasknutí buňky, což vede k poničení tkáně (Proskuryakov et al., 2003).

### 3. MSC a apoptóza

#### 3.1 Ochrana MSC před apoptózu

Využití MSC v buněčné terapii je omezeno jejich citlivostí k oxidativnímu stresu a hypoxii. Prostředí, do kterého jsou často přenášeny, je prozánětlivé, ovlivněné chemoterapií, radioterapií a obsahující velké množství proapoptotických faktorů. Přenos MSC do takového prostředí vede k jejich senescenci a apoptóze. Na druhou stranu MSC díky prozánětlivému prostředí aktivují své imunomodulační vlastnosti. Nejnovější studie uvádí, že BM-MSC jsou citlivé k IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , které společným působením vyvolávají apoptózu u BM-MSC. Dochází ke zvýšené produkci NOS, což vede k expresi Bak, Bax a Fas receptoru na povrchu MSC. K apoptóze BM-MSC dochází i u Fas<sup>-</sup> BM-MSC (Li et al., 2019).

Hlavní příčinou apoptózy u MSC je oxidativní stres, ale existují molekuly, které prodlužují přežívání MSC v takovémto prostředí. Jedním ze způsobů, jak ochránit MSC před oxidativním stresem a apoptózou je indukce zvýšené exprese nukleárního faktoru odvozeného z erythroidů 2 (nuclear factor (erythroid-derived 2) – related factor 2, Nrf-2) pomocí adenovirového vektoru. Nrf-2 indukuje expresi antioxidantů superoxid dismutázy a hemoxygenázy 1 (Mohammadzadeh et al., 2012). Využití Nrf-2 je ale značně omezeno kvůli riziku progresu nádoru a jeho schopnosti detoxifikovat protinádorová léčiva (Kim et al., 2007). Dalším možností ochrany MSC před buněčným stresem je laktoferin. Jedná se o antioxidant, který snižuje množství reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS), aktivitu kaspázy 3 a zvyšuje aktivitu Akt dráhy, čímž prodlužuje přežívání MSC v nepříznivých podmínkách (Park et al., 2017). Lipoprotein s vysokou hustotou podobně zvyšuje aktivitu Akt a snižuje produkci ROS u poškození myokardu (Xu et al., 2012).

Studie věnující se prodloužení životnosti MSC po transplantaci u cévní mozkové příhody využila tetramethylpyrazin, který zvyšuje aktivitu Akt a expresi Bcl-2, který se vyskytuje na vnější mitochondriální membráně, což vede k přežívání buňky. Snižuje expresi apoptotického Bax, který způsobuje vznik kanálu do mitochondriální membrány, čímž se změní napětí na membráně a dojde k uvolnění cytochromu c (Fang et al., 2017). Exendin-4 byl použit ke studiu infarktu myokardu. Jeho podání v přítomnosti MSC izolovaných z tukové tkáně (adipose-derived mesenchymal stem cells, AD-MSC) zvyšuje expresi superoxid dismutázy (SOD), která se podílí na snižování ROS. Exendin-4 dále aktivuje fosforylací Akt dráhu, zvyšuje expresi Bcl-2 a snižuje expresi Bax a cytochromu c (Liu et al., 2014).

Jinou možností ochrany MSC před oxidativním stresem indukovanou senescencí je overexprese katalytické podjednotky telomerázy (hTERT), která chrání před ROS. Její zvýšení vedlo k vyšší aktivitě

antioxidačních enzymů, SOD a katalázy (Trachana et al., 2017). Další možností je Omentin-1, který má proproliferační, propřeživací a ochranné účinky proti peroxidem-indukované apoptóze na MSC, odstraňuje ROS, zvyšuje Bcl-2 a snižuje Bax (Yin et al., 2017). Jiný přístup využívá inhibice pomocí microRNA16 (miR-16), která zastavuje buněčnou proliferaci a snižuje expresi Bcl-2 (Rui et al., 2018).

Oddálení senescence a apoptózy MSC je v současnosti studováno různými metodami od přidávání solubilních molekul po indukci exprese proteinů v samotných MSC. Nález vhodné kombinace může přinést významný pokrok pro využití MSC v buněčné terapii.

## **3.2 Modulace apoptózy pomocí MSC**

### **3.2.1 Indukce apoptózy**

#### **3.2.1.1 Indukce apoptózy u nádorových buněk**

##### **3.2.1.1.1 TRAIL**

Možností protinádorové léčby je využití molekuly TRAIL. Dle Nieminena et al. (2007) cílí však pouze na nádorové buňky a pro pacienty je bezpečný (Ashkenazi et al., 1999; Kelley et al., 2001), čímž je v rozporu s výzkumy, které zaznamenaly apoptózu způsobenou TRAIL u lidských hepatocytů, lidských thymocytů a epitelových buněk (Jo et al., 2000; Nesterov et al., 2002; Simon et al., 2001; Taimr et al., 2003).

Molekula TRAIL má 2 formy. Kratší, solubilní (sTRAIL) a delší, membránově vázanou (mTRAIL), obě tyto formy mají apoptotický potenciál (Wajant et al., 2001). Využití transdukce vneseného sTRAIL bylo omezeno krátkou životností kvůli clearance ledvin a nízkou farmakokinetikou (Kelley et al., 2001), čemuž se Grisendi et al. (2010) vyhlí stálou transdukci.

MSC za normálních podmínek neexprimují TRAIL (Yuan et al., 2015). Při kultivaci MSC s TNF- $\alpha$  došlo k expresi TRAIL a zefektivnění vyvolání apoptózy pomocí MSC (Lee et al., 2012). Grisendi et al. geneticky modifikovali MSC k expresi TRAIL pomocí transdukce retrovirovým vektorem (MSC-TRAIL). Tento *in vitro* i *in vivo* pokus s buněčnými liniemi Ewingova sarkomu (ES), rabdomyosarkomu a osteosarkomu ověřil schopnost MSC-TRAIL přežít v nádorovém prostředí, indukovat apoptózu nádorových buněk mitochondriální cestou skrz kaspázu 8 a snížit angiogenezi v nádorovém prostředí (Grisendi et al., 2015). V další práci byly porovnány MSC exprimující kratší formu (sTRAIL) s delší formou (mTRAIL) a bylo zjištěno, že obě formy mají proapoptotický charakter. Membránová forma mTRAIL lépe vyvolává apoptózu u nádorových buněk. To je způsobeno

pravděpodobně tím, že na rozdíl od sTRAIL, se nachází na povrchu MSC, kde dochází k jejich shlukování. Další výhodou mTRAIL je schopnost obejít rezistenci některých nádorových buněk (Yuan et al., 2015).

AD-MSC s transdukovaným TRAIL byly schopny migrovat do nádorového prostředí a vyvolat apoptózu. Tato studie tvrdí, že nejdůležitější k indukci apoptózy je buněčný kontakt. AD-MSC s TRAIL vyvolaly apoptózu u HeLa buněk, primárních nádorových buněk v rakovině plic a omezily růst nádoru u rakoviny děložního čípku u myší s vnesenými lidskými buňkami (Grisendi et al., 2010).

Z již výše zmíněného důvodu, že TRAIL je schopen vyvolat apoptózu i u nenádorových buněk, byl vnesen TRAIL pod promotor IL-6, který je exprimován MSC za přítomnosti IL-1 (Carter et al., 1990). V nádorovém prostředí dochází k nadprodukci IL-1 (Lewis et al., 2006). V *in vivo* pokusu došlo k cílené apoptóze u nádorových buněk mnohočetného myelomu U-266 (Cafforio et al., 2017).

Buněčný kontakt v nádorovém prostředí bývá problematický, například s vyšší úspěšností dochází k vyvolání apoptózy, jak bylo zmíněno již výše. Pomocí různých molekul dochází k silnější aktivaci či inhibici buněk a proto jsou hledány způsoby, jak se mu vyvarovat. Například vytvořením rekombinantních forem sTRAIL, které mají schopnost multimerizovat TRAIL receptor, a tím zvýšit jeho cytotoxicitu (Spano et al., 2019). Další možností jsou extracelulární vesikuly (EV) k doručení TRAIL pomocí MSC do nádorového prostředí. EV jsou přírodní nanočástice schopné infiltrovat velké množství tkání, například i mozek (Alvarez-Erviti et al., 2011). MSC přirozeně produkují velké množství exosomů a tím jsou vhodné pro terapii pomocí EV (Yeo et al., 2013). MSC mohou být snadno geneticky modifikovány k produkci exosomů obsahující TRAIL. V pokusu Yuan et al. (2017) MSC-EV vykazují vyšší cytotoxickou aktivitu ve spojení s inhibitory cyklin-dependentní kinázy 9 (CDK9) SNS032. Jejich další výhodou je vyšší efektivita vyvolání apoptózy u TRAIL rezistentních nádorových buněk.

### **3.2.1.1.2 Další způsoby indukce apoptózy nádorových buněk**

Některé studie ukázaly, že přítomnost MSC bez genetické modifikace stačí ke vzniku proapoptotického prostředí. Studie Atsuta et al. (2013) ukazuje, že podání BM-MSC myším trpících mnohočetným myelomem zmenšuje nádory v plicích a ledvinách skrz Fas/FasL indukovanou apoptózu. Kokultivace lidských MSC získaných z pupečníkové krve (human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSC) s buňkami hepatocelulárního karcinomu Hep62 vedla ke zvýšení apoptózy nádorových buněk a snížení antiapoptotických proteinů Bcl-2 a  $\alpha$  fetoproteinu (Tang et al., 2016). *In vitro* a následně i *in vivo* pokus s mikrovezikuly MSC získaných z Whartonova rosolu ukazuje, že přidání těchto váčků k nádorovým buňkám močového měchýře T24, vedlo k zastavení těchto buněk v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi



upregulací p53 a p21. Došlo také ke snížení fosforylace Akt dráhy a ke zvýšení produkce kaspázy 3 (Wu et al., 2013). Dalším příkladem je kultivace MSC v přítomnosti paclitaxelu (PTX), protinádorového lipofilního léku, který působí na nádorové buňky tak, že aktivuje polymerizaci mikrotubulů, čímž dojde k zastavení mitózy v G2/M fázi. Po kultivaci, dochází k inkorporaci PTX do MSC, které je následně uvolňováno *in vitro* i *in vivo* v nádorovém prostředí a dochází k redukci nádoru (Pessina et al., 2011). Wang et al. (2018) injikovali nanočástice vyrobené s příměsí PTX do MSC, u kterých byla po určité době pozastavena proliferace a schopnost migrace. V *in vivo* nádorovém prostředí gliomových buněk C6 došlo k uvolnění PTX a 7 dní po léčbě byla pozorována apoptóza nebo nekróza.

### 3.2.1.2 Indukce apoptózy u buněk imunitního systému

Mezi imunomodulační vlastnosti MSC lze řadit i regulaci T lymfocytů pomocí FasL apoptotické dráhy. Mazar et al. (2009) detekovali přítomnost FasL a FasR na BM-MSC. Nepodařilo se jim pomocí protilátky anti-FasR vyvolat apoptózu BM-MSC, což může být jeden ze způsobů ochrany BM-MSC. Pokusy s indukcí apoptózy u lymfocytů byly mnohem úspěšnější při použití již aktivovaných lymfocytů. Tento výzkum rozšiřuje Akiyama et al. (2012) pokusem, ve kterém BM-MSC indukovaly apoptózu u aktivovaných T lymfocytů. To vedlo k produkci TGF- $\beta$  makrofágy, upregulaci Treg a imunotoleranci. Tím potvrdili experiment Perruchiho et al. (2008), který podáním antiCD3 specifické protilátky snížil množství T lymfocytů, což vedlo také k produkci TGF- $\beta$ , aktivaci Treg a imunotoleranci. Akiyama et al. (2012) ve svém pokusu studovali terapeutický potenciál u systémové sklerózy. Primární klinický výzkum ověřil tyto vlastnosti BM-MSC, po dobu jednoho roku nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky a došlo ke zlepšení průběhu onemocnění.

Další možností indukce apoptózy u aktivovaných a konvenčních T lymfocytů (Tconv) je spuštění dráhy ligandu 1 programované buněčné smrti, který MSC na svém povrchu exprimují (Tipnis et al., 2010), Plumas ho ovšem nedetekoval (Plumas et al., 2005). Kultivace Tconv v přítomnosti MSC přes solubilní faktory zvyšuje exprese PD-1 na Tconv. Ty jsou poté náchylnější k apoptóze. Tato studie ukazuje, že indukce apoptózy neměla vliv na zvýšení TGF- $\beta$  a IL-10 (Yan et al., 2014), čímž se rozchází se závěry Donga et al. (1999) o zvýšené produkci IL-10 a Genga et al. (2006).

Novější studie uvádí, že MSC jsou schopny v reakci na IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  exprimovat PD-L1 a PD-L2, které vyvolávají apoptózu u aktivovaných T lymfocytů. V přítomnosti IFN- $\gamma$  se exprimuje především PD-L1, při stimulaci TNF- $\alpha$  se produkují oba PD-L, ale PD-L2 vzniká více. Vazba PD-L1,2 na CD4+ i CD8+ T lymfocytů snižuje sekreci IL-2, což vede k jejich anergii (Bishop et al., 2009; Chikuma et al., 2009; Davies et al., 2017).

Aktivované T lymfocyty produkují IFN- $\gamma$ , a proto MSC v jejich přítomnosti produkují IDO, což u nich vyvolává apoptózu i přes přítomnost IL-2 a IFN- $\gamma$ , které mají buňky před AICD chránit (Plumas et al., 2005). Tento mechanismus podporuje přežívání a růst nádorových buněk. Myší MSC exprimující lidskou IDO, která byla pod promotorem myšího iNOS, způsobily apoptózu aktivovaných lymfocytů v *in vivo* pokusu u myši s melanomem, čímž došlo k imunosupresi a podpoře růstu nádoru. (Ling et al., 2014).

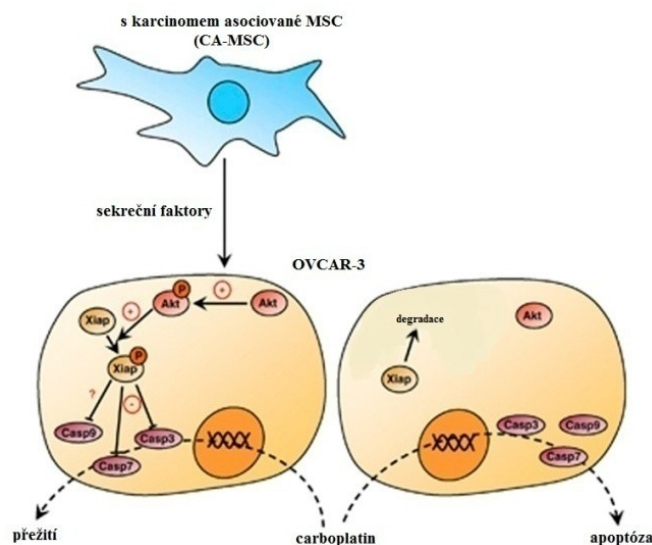
Proapoptotické vlastnosti MSC byly studovány u hypersenzitivní reakce oddáleného typu (delayed type hypersensitivity, DTH). Myší BM-MSC označené zeleným fluorescenčním proteinem se při DTH v malém množství akumulují na rozhraní parakortikální a germinální zóny lymfatických uzlin, kde jsou v kontaktu s různými imunitními buňkami. Během DTH vyvolávají MSC apoptózu skrz NO v lymfatických uzlinách především u aktivovaných T lymfocytů, v menší míře u B lymfocytů a makrofágů. DTH probíhá v mírnější formě. (Lim et al., 2010).

Potenciál proapoptotických vlastností je studován na myších modelech SLE. Injekce hUC-MSC do myšího modelu SLE vedla k apoptóze Th1 a Th2 CD4<sup>+</sup> T lymfocytů v periferní krvi zatím neznámým mechanismem. Jelikož tyto T lymfocyty hrají klíčovou roli v regulaci onemocnění, došlo ke snížení proteinurie a lézí na ledvinách (Huang et al., 2018).

### **3.2.2 Inhibice apoptózy**

#### **3.2.2.1 Inhibice apoptózy u nádorových buněk**

Schopnost MSC migrovat do nádorového prostředí (Kidd et al., 2009) má i své nevýhody. V případě nádoru epitelových buněk vaječníku způsobuje přítomnost MSC rezistenci vůči chemoterapeutiku carboplatin (Castells et al., 2013). Toto chemoterapeutikum způsobuje poškození DNA rozvolněním nukleové kyseliny, degradaci X vázaného inhibitorového apoptotického proteinu (X linked inhibitor of apoptosis protein XIAP) a aktivaci efektorových kaspáz 3, 7 a 9 (Bellon et al., 1991). MSC asociované s karcinomem (carcinoma-associated MSC CA-MSC) indukují chemorezistenci vaječnickových rakovinných buněk 3 vůči carboplatinu. V jeho přítomnosti CA-MSC indukují stimulaci Akt dráhy fosforylací, stabilizují fosforylací XIAP, který blokuje efektorové kaspázy 3 a 7 (Obr. 6) (Castells et al., 2013).



**Obr. 5 Vliv CA-MSC na působení chemoterapeutika carboplatin** (upraveno podle: Castells et al., 2013)

MSC oslabují funkci protinádorového léčiva cisplatinu snížením apoptózy a zvýšením proliferace MCF-7 buněčné linie rakoviny prsu (Xu et al., 2017). Efektu přežívání buněk v přítomnosti lidských BM-MSC a cisplatinu bylo studováno již dříve u HK-2 buněk lidského proximálního tubulu ledvin. Chemoterapeutikum cisplatin svými toxickými účinky způsobuje akutní selhání ledvin. Přidané hBM-MSC zvyšují množství nafsorylovaného Akt, což vede k přežívání buněk (Eliopoulos et al., 2010).

Další práce uvádějící pronádorové a antiapoptotické účinky MSC je výzkum Ramasamy et al. (2007), který ukazuje, že MSC jsou schopny držet nádorové buňky v Go/G1 fázi buněčného cyklu pomocí downregulace CKD2 a cyklin dependentní kinázy 4 (CDK4) a to je spojeno se snížením apoptózy u těchto buněk. Tito autoři varují před užitím MSC u pacientů s maligními onemocněními.

### 3.2.2.2 Inhibice apoptózy u imunitních buněk

#### 3.2.2.2.1 Neutrofily

Neutrofily hrají důležitou roli v imunitě jedince. Kultivace IL-8 aktivovaných i neaktivovaných neutrofilů za přítomnosti MSC, bez potřeby buněčného kontaktu, vede k inhibici apoptózy (Raffaghello et al., 2008). MSC dále produkují IL-6 (Kim et al., 2005), který inhibuje apoptózu neutrofilů (Asensi et al., 2004). V dalším experimentu došlo po kultivaci ke snížení Bax, zvýšení antiapoptotického indukovaného diferenciatního proteinu myeloidního leukemických buněk a inhibici oxidativního metabolismu. Tento pokus vychází z hypotézy, že MSC v kostní dřeni chrání efektorové funkce neutrofilů, inhibují jejich oxidativní mechanismy a chrání je před apoptózou (Raffaghello et al., 2008).

Tkáňově specifické MSC ze slinné žlázy stimulované pomocí LPS přes toll like receptor 4 produkovaly prozánětlivé cytokiny. Mezi tyto patří i IL-8 a inhibiční faktor migrace makrofágů. Tyto cytokiny způsobují migraci polymorfonukleárních leukocytů, tedy i neutrofilů, pro které je typická krátká životnost spojená se spontánní apoptózou. V experimentu, kde byly pomocí LPS aktivované MSC kultivované s neutrofily došlo k oddálení apoptózy (Brandau et al., 2010). Novější studie ukazuje, že MSC jsou schopny zachránit neutrofily před apoptózou způsobenou nedostatkem živin, mechanismus je zatím nejasný (Maqbool et al., 2011). Zdá se, že MSC stimulované nízkou (0,1 mM) až střední (0,5 mM) dávkou kofeinu snižují produkci ROS neutrofilů, a tím je ochraňují před apoptózou (Abbasi et al., 2018).

#### **3.2.2.2.2 B lymfocyty**

Dle jedné studie MSC zvyšují přežívání B lymfocytů periferní krve. Buněčným kontaktem dochází ke zvýšené expresi růstového faktoru cévního endotelu (vascular endothelial growth factor, VEGF), čímž se zvýší aktivita Akt dráhy (Abid et al., 2004) a to zapříčiní inhibici efektorové kaspázy 3 (Zhou et al., 2000). Z důvodu schopnosti MSC prodloužit přežívání B lymfocytů tato studie nedoporučuje používat MSC v léčbě onemocnění asociovaných s B lymfocyty (Healy et al., 2015).

EV izolované z BM-MSC, které byly následně kultivované a integrované do B lymfocytů pacientů s chronickou lymfoidní leukémií, snížily spontánní i léky vyvolanou apoptózu u těchto buněk. Došlo ke zvýšení Bcl-xL a XIAP, Bax zůstal beze změny. Vnesením aktinomycinu do B lymfocytů před podáním EV nezpůsobilo žádné změny B lymfocytu, a proto EV mají vliv na transkripci *de novo*. BM-MSC mají zvýšenou produkci EV v porovnání se zdravými jedinci a jejich EV mají vyšší účinnost na B lymfocyty (Crompton et al., 2017).

#### **3.2.2.2.3 T lymfocyty**

Při vyvolání AICD u dělících se i klidových T lymfocytů pomocí anti-CD3 protilátky, dochází ke snížení apoptózy v přítomnosti MSC, které T lymfocyty ochraňují. MSC způsobují snížení exprese Fas i FasL na povrchu T lymfocytů procházejících AICD, dále snižují aktivitu kaspáz a dále brání intracelulárnímu uvolnění granzymu B (Benvenuto et al., 2007). Důležitým cytokinem v ochraně T lymfocytů před apoptózou je IL-7, který slouží ke stimulaci lymfoidních progenitorů, a je také produkovaný lidskými BM-MSC. Kokultivace těchto BM-MSC s phytohemaglutinem nebo DC stimulovanými T lymfocyty vedla k produkci IL-7, který oddálil apoptózu u T lymfocytů. Buněčný kontakt není nezbytný, ale dochází při něm k nejúčinnější ochraně. Deplecí IL-7 došlo k opětovnému zvýšení apoptózy u T lymfocytů (Normanton et al., 2014). Dalším důležitým cytokinem v ochraně

T lymfocytů před apoptózou je IL-6 produkováný MSC, který má antiapoptotický efekt. Xu et al. (2007) se domnívá, že k produkci IL-6 dochází až po buněčném kontaktu MSC a T lymfocytů.

#### **3.2.2.2.4 Další buňky**

Antiapoptotické vlastnosti MSC jsou studovány i v souvislosti s diabetem mellitus. Buňky Langerhansových ostrůvků jsou náchylné k oxidativnímu stresu, což zapříčiňuje jejich destrukci a zhoršený průběh onemocnění. V pokusu, kde byl indukován oxidativní stres pomocí  $H_2O_2$  na buněčnou linii pankreatických ostrůvků, MS-1, došlo ke snížení apoptózy a blokaci indukce kaspázy 3 v kokultivaci s BM-MSC (Wang et al., 2017).

V experimentu se sto pacienty s neurologickými onemocněními došlo k inhibici apoptózy neurocytů po opakované subarachnoidální transplantaci lidských UC-MSC. K inhibici apoptózy došlo skrze aktivaci phospho-p 44/42 ERK1/2 z rodiny mitogenem aktivovaných proteinkináz. U pacientů nebyly pozorovány žádné dlouhotrvající nežádoucí účinky (Zhang et al., 2015). V případě radioaktivitou indukovaným poškození mozku u myši došlo k inhibici apoptózy neuronů a astrocytů podáním hUC-MSC v kombinaci s léčivem nimodipin, ale i bez něj. Se současným podáním nimodipinu bylo dosaženo lepších výsledků, které vedly ke zlepšení lokomoce a kognitivních vlastností myši mechanismem snížení Bax a zvýšení Bcl-2 (Wang et al., 2016).

## Závěr

Jedno z možných využití MSC je boj proti rakovině. Velká pozornost je věnována molekule TRAIL, která je MSC exprimována v přítomnosti TNF- $\alpha$ . Některé práce pro zefektivnění apoptózy tuto molekulu transdukuje virovým vektorem, tvoří rekombinantní formy sTRAIL, který vyvolává multimerizaci receptorů TRAIL na cílové buňce nebo geneticky modifikují MSC k tvorbě velkého množství exosomů obsahujících TRAIL. Potenciál této molekuly je omezen schopností vyvolávat apoptózu i u zdravých buněk, např. hepatocytů, thymocytů nebo epitelových buněk. Existují studie, které tento fakt popírají a tvrdí, že TRAIL cílí pouze na nádorové buňky a pro pacienty je bezpečný. Další studie tvrdí, že přítomnost nemodifikovaných MSC dokáže vyvolat apoptózu, např. skrz Fas/FasL nebo mikrovezikuly snižujícími fosforylaci Akt a zvyšujícími produkci kaspázy 3. Tyto výsledky jsou v rozporu s prací Ramasamy et al. (2007), kteří pozorovali, že MSC inhibovaly apoptózu nádorových buněk a držely tyto buňky v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu. MSC v některých případech působí proti účinku chemoterapeutik. V přítomnosti carboplatinu působí na nádorové buňky antiapoptoticky. V jiné studii MSC slouží jako efektivní nosič protinádorového léku PTX.

Výsledky studií jsou rozdílné a je potřeba dalšího výzkumu k hlubšímu pochopení těchto mechanismů, aby bylo dosaženo bezpečného podání. V současnosti probíhá 7 klinických studií týkajících se využití MSC k léčbě rakoviny, žádná z těchto studií však nevyužívá apoptotické a antiapoptotické vlastnosti MSC (převzato z [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov))

Indukce apoptózy imunitních buněk u pacientů s autoimunitními onemocněními se jeví velice slibně. Například vyvolání apoptózy T lymfocytů pomocí Fas/FasL vedlo k aktivaci Treg a imunotoleranci u pacientů se systémovou sklerodermií. Indukce apoptózy pomocí MSC vedla k následnému zlepšení průběhu i u SLE a DTH. Na druhou stranu v nádorovém prostředí s IFN- $\gamma$  dochází k indukci IDO u MSC, což zapříčiňuje apoptózu T lymfocytů, tímto mechanismem je podporován růst a přežívání nádorů.

Produkci IL-6 a IL-7 ochraňují MSC T lymfocyty a produkci IL-6 a IL-8 neutrofily před apoptózou. K přežívání B lymfocytů dochází po buněčném kontaktu se MSC společně se zvýšenou produkcí VEGF. Dle této studie není tedy vhodné použití MSC u onemocnění asociovaných s poruchou B lymfocytů. Tento závěr podporují i studie z nedávné doby, kdy EV MSC byly integrovány do B lymfocytů pacientů s chronickou myeloidní leukemií a došlo k inhibici spontánní i léky vyvolané apoptózy těchto buněk.

Efekt antiapoptotických vlastností MSC je studován i v souvislosti s diabetem mellitus a neurodegenerativními onemocněními. V obou případech došlo po podání MSC k prodloužení přežívání buněk a zlepšení průběhu onemocnění.

Tato bakalářská práce shrnuje současné poznatky o apoptotických a antiapoptotických vlastnostech MSC. Tyto poznatky se v mnohých případech od sebe velice liší. Například v jedné studii vede přítomnost IFN- $\gamma$  k vyvolání apoptózy u MSC, v jiné stimuluje expresi PD-L1 a IDO. Z důvodu pleiotropního efektu MSC má jejich podání určitá rizika, která by měla být brána vždy v úvahu.

## Seznam citací

\* označuje sekundární citaci

Abbasi, A., Froushani, S.M.A., Delirez, N., and Mostafaei, A. (2018). Caffeine alters the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neutrophils. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27, 463–468.

Abid, M.R., Guo, S., Minami, T., Spokes, K.C., Ueki, K., Skurk, C., Walsh et al. (2004). Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24, 294–300.

Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T. et al. (2012). Mesenchymal stem cell-induced immunoregulation involves Fas ligand/Fas-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*, 10, 544–555.

Alizadeh, R., Bagher, Z., Kamrava, S.K., Falah, M., Ghasemi Hamidabadi, H., Eskandarian Boroujeni, M. et al. (2019). Differentiation of human mesenchymal stem cells (MSC) to dopaminergic neurons: A comparison between Wharton's Jelly and olfactory mucosa as sources of MSCs. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 96, 126–133.

Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., and Wood, M.J.A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29, 341–345.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A. et al. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *Journal Clinical Investigation*, 104, 155–162.

Atsuta, I., Liu, S., Miura, Y., Akiyama, K., Chen, C., An, Y. et al. (2013). Mesenchymal stem cells inhibit multiple myeloma cells via the Fas/Fas ligand pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 4, 111.

Beeravolu, N., McKee, C., Alamri, A., Mikhael, S., Brown, C., Perez-Cruet, M. et al. (2017). Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *Journal of Visualized Experiments*, 122, e55224.

Bellon, S.F., Coleman, J.H., and Lippard, S.J. (1991). DNA unwinding produced by site-specific intrastrand crosslinks of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*, 30, 8026–8035.

Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., Gualandi, F., Frassoni, F., Pistoia, V. et al. (2007). Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, 25, 1753–1760.

Bishop, K.D., Harris, J.E., Mordes, J.P., Greiner, D.L., Rossini, A.A., Czech, M.P. et al. (2009). Depletion of the programmed death-1 receptor completely reverses established clonal anergy in CD4(+) T lymphocytes via an interleukin-2-dependent mechanism. *Cell Immunology*, 256, 86–91.

\*Bradshaw, A., Wickremsekera, A., Tan, S.T., Peng, L., Davis, P.F., Itinteang, T. (2016). Cancer stem cell hierarchy in glioblastoma multiforme. *Frontiers in Surgery*, 3, 21.

Brandau, S., Jakob, M., Hemeda, H., Bruderek, K., Janeschik, S., Bootz, F. et al. (2010). Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *Journal Leukocyte Biology*, 88, 1005–1015.

Cafforio, P., Viggiano, L., Mannavola, F., Pellè, E., Caporusso, C., Maiorano, E. et al. (2017). pIL6-TRAIL-engineered umbilical cord mesenchymal/stromal stem cells are highly cytotoxic for myeloma cells both in vitro and in vivo. *Journal of Stem Cell Research and Therapy*, 8, 206.

\*Carter, A., Merchav, S., Silvian-Draxler, I., and Tatarsky, I. (1990). The role of interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in human multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 74, 424–431.



Castells, M., Milhas, D., Gandy, C., Thibault, B., Rafii, A., Delord, J.-P. et al. (2013). Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death and Disease*, 4, e887.

Chabannes, D., Hill, M., Merieau, E., Rossignol, J., Brion, R., Souillou, J.P. et al. (2007). A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*, 110, 3691–3694.

Cheifetz, S., Bellón, T., Calés, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massagué, J. et al. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *Journal Biological Chemistry*, 267, 19027–19030.

\*Chen, X., Ye, S., and Ying, Q.-L. (2015). Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: past, current and future. *BMB Reports*, 48, 668-676.

Chiesa, S., Morbelli, S., Morando, S., Massollo, M., Marini, C., Bertoni, A. et al. (2011). Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17384–17389.

Chikuma, S., Terawaki, S., Hayashi, T., Nabeshima, R., Yoshida, T., Shibayama, S. et al. (2009). PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8<sup>+</sup> T cell anergy in vivo. *The Journal of Immunology*, 182, 6682–6689.

Crompton, E., Van Damme, M., Pieters, K., Vermeersch, M., Perez-Morga, D., Mineur, P. et al. (2017). Extracellular vesicles of bone marrow stromal cells rescue chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis, enhance their migration and induce gene expression modifications. *Haematologica*, 102, 1594–1604.

Cui, L., Yin, S., Liu, W., Li, N., Zhang, W., Cao, Y. (2007). Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Engineering*, 13, 1185–1195.

Davies, L.C., Heldring, N., Kadri, N., Le Blanc, K. (2017). Mesenchymal stromal cell secretion of programmed death-1 ligands regulates T cell mediated immunosuppression. *Stem Cells*, 35, 766–776.

Deng, M., Mei, T., Hou, T., Luo, K., Luo, F., Yang, A. et al. (2017). TGFβ3 recruits endogenous mesenchymal stem cells to initiate bone regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*, 8, 258.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D. et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315–317.

Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*, 5, 1365–1369.

Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B., Zipp, F. (2003). Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine*, 24, 244–253.

Eliopoulos, N., Zhao, J., Bouchentouf, M., Forner, K., Birman, E., Yuan, S. et al. (2010). Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin renotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 299, F1288–F1298.

\*Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495–516.

\*Falschlehner, C., Schaefer, U., Walczak, H. (2009). Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*, 127, 145–154.

Fang, Y., Chu, L., Li, L., Wang, J., Yang, Y., Gu, J. et al. (2017). Tetramethylpyrazine protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis through PI3K/Akt and ERK1/2 pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40, 2146–2152.

Fanger, N.A., Maliszewski, C.R., Schooley, K., Griffith, T.S. (1999). Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Trail). *The Journal of Experimental Medicine*, 190, 1155–1164.

\*Gao, F., Chiu, S.M., Motan, D.A.L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H.-L. et al. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death and Disease* 7, e2062.

Geis, F.K., Galla, M., Hoffmann, D., Kuehle, J., Zychlinski, D., Maetzig, T. et al. (2017). Potent and reversible lentiviral vector restriction in murine induced pluripotent stem cells. *Retrovirology*, 14, 34.

Geng, L., Jiang, G., Fang, Y., Dong, S., Xie, H., Chen, Y. et al. (2006). B7-H1 expression is upregulated in peripheral blood CD14<sup>+</sup> monocytes of patients with chronic hepatitis B virus infection, which correlates with higher serum IL-10 levels. *Journal of Viral Hepatitis*, 13, 725–733.

Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W.-F., Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105, 2821–2827.

Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R., Fanger, N.A. (1999). Monocyte-mediated Tumoricidal Activity via the Tumor Necrosis Factor-related Cytokine, TRAIL. *The Journal of Experimental Medicine*, 189, 1343–1354.

Grisendi, G., Bussolari, R., Cafarelli, L., Petak, I., Rasini, V., Veronesi, E. et al. (2010). Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Research*, 70, 3718–3729.

Halaas, O., Vik, R., Ashkenazi, A., Espevik, T. (2000). Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 51, 244–250.

Healy, M.E., Bergin, R., Mahon, B.P., English, K. (2015). Mesenchymal stromal cells protect against caspase 3-mediated apoptosis of CD19<sup>+</sup> peripheral B cells through contact-dependent upregulation of VEGF. *Stem Cells*, 24, 2391–2402.

Hentze, H., Soong, P.L., Wang, S.T., Phillips, B.W., Putti, T.C., Dunn, N.R. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Research*, 2, 198–210.

Hochedlinger, K., Jaenisch, R. (2015). Induced pluripotency and epigenetic reprogramming. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, a019448.

Huang, S., Wu, S., Zhang, Z., Deng, W., Fan, J., Feng, R. et al. (2018). Mesenchymal stem cells induced CD4<sup>+</sup> T cell apoptosis in treatment of lupus mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 507, 30–35.

Jo, M., Kim, T.H., Seol, D.W., Esplen, J.E., Dorko, K., Billiar, T.R. et al. (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nature Medicine*, 6, 564–567.

Kelley, S.K., Harris, L.A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J. et al. (2001). Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299, 31–38.

Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A. et al. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*, 27, 2614–2623.

- Kim, D.H., Yoo, K.H., Choi, K.S., Choi, J., Choi, S.-Y., Yang, S.-E. et al. (2005). Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine*, 31, 119–126.
- Kinter, A.L., Godbout, E.J., McNally, J.P., Sereti, I., Roby, G.A., O'Shea et al. (2008). The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *The Journal of Immunology*, 181, 6738–6746.
- \*Landgren, H., Curtis, M.A. (2011). Locating and labeling neural stem cells in the brain. *Journal of Cellular Physiology*, 226, 1–7.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I. et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, 2, 261–268.
- Lee, R.H., Yoon, N., Reneau, J.C., Prockop, D.J. (2012). Preactivation of human MSCs with TNF- $\alpha$  enhances tumor-suppressive activity. *Cell Stem Cell*, 11, 825–835.
- Lewis, A.M., Varghese, S., Xu, H., Alexander, H.R. (2006). Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*, 4, 48.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491–501.
- Li, X., Aleardi, A., Wang, J., Zhou, Y., Andrade, R., Hu, Z. (2016). Differentiation of spiral ganglion-derived neural stem cells into functional synaptogenetic neurons. *Stem Cells Development*, 25, 803–813.
- Li, X., Shang, B., Li, Y., Shi, Y., Shao, C. (2019). IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, 18.
- Lim, J.-H., Kim, J.-S., Yoon, I.-H., Shin, J.-S., Nam, H.-Y., Yang et al. (2010). Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node. *The Journal of Immunology*, 185, 4022–4029.
- Ling, W., Zhang, J., Yuan, Z., Ren, G., Zhang, L., Chen, X. et al. (2014). Mesenchymal stem cells Employ IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Research*, 74, 1576–1587.
- Liu, H., Wang, Y., Zeng, Q., Zeng, Y.-Q., Liang, C.-L., Qiu, F. et al. (2017). Suppression of allograft rejection by CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Tregs is dictated by their Fas ligand-initiated killing of effector T cells versus Fas-mediated own apoptosis. *Oncotarget*, 8, 24187–24195.
- Liu, J., Wang, H., Wang, Y., Yin, Y., Du, Z., Liu, Z. et al. (2014). The stem cell adjuvant with Exendin-4 repairs the heart after myocardial infarction via STAT3 activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18, 1381–1391.
- Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S. et al. (2014). The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in peyronie's disease. *Biomed Research International*, vydání 2014.
- Malyshkina, A., Littwitz-Salomon, E., Sutter, K., Zelinsky, G., Windmann, S., Schimmer, S. et al. (2017). Fas Ligand-mediated cytotoxicity of CD4<sup>+</sup> T cells during chronic retrovirus infection. *Scientific Reports*, 7, 7785.
- Maqbool, M., Vidyadaran, S., George, E., Ramasamy, R. (2011). Human mesenchymal stem cells protect neutrophils from serum-deprived cell death. *Cell Biology International*, 35, 1247–1251.

Mazar, J., Thomas, M., Bezrukov, L., Chanturia, A., Pekkurnaz, G., Yin, S. et al. (2009). Cytotoxicity mediated by the Fas Ligand (FasL)-activated apoptotic pathway in stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 22022–22028.

\*Medvedev, S.P., Shevchenko, A.I., Zakian, S.M. (2010). Induced pluripotent stem cells: problems and advantages when applying them in regenerative medicine. *Acta Naturae*, 2, 18–28.

\*Medvinsky, A., Livesey, F.J. (2015). On human development: lessons from stem cell systems. *Development*, 142, 17–20.

Mohammadzadeh, M., Halabian, R., Gharehbaghian, A., Amirizadeh, N., Jahanian-Najafabadi, A., Roushandeh, A.M. et al. (2012). Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. *Cell Stress Chaperones*, 17, 553–565.

\*Munn, D.H., Mellor, A.L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in Immunology*, 34, 137–143.

Nesterov, A., Ivashchenko, Y., Kraft, A.S. (2002). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene*, 21, 1135–1140.

Nieminen, A.I., Partanen, J.I., Hau, A., Klefstrom, J. (2007). c-Myc primed mitochondria determine cellular sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *The EMBO Journal*, 26, 1055–1067.

\*Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134, 635–646.

Normanton, M., Alvarenga, H., Hamerschlag, N., Ribeiro, A., Kondo, A., Rizzo, L.V. et al. (2014). Interleukin 7 plays a role in T lymphocyte apoptosis inhibition driven by mesenchymal stem cell without favoring proliferation and cytokines secretion. *PLoS ONE*, 9, e106673

Paauwe, M., Heijkants, R.C., Oudt, C.H., van Pelt, G.W., Cui, C., Theuer, C.P. et al. (2016). Endoglin targeting inhibits tumor angiogenesis and metastatic spread in breast cancer. *Oncogene*, 35, 4069–4079.

Park, M.-J., Kwok, S.-K., Lee, S.-H., Kim, E.-K., Park, S.-H., Cho, M.-L. (2015). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of interleukin-10-producing regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Cell Transplantation*, 24, 2367–2377.

Park, S.Y., Jeong, A.-J., Kim, G.-Y., Jo, A., Lee, J.E., Leem, S.-H. et al. (2017). Lactoferrin protects human mesenchymal stem cells from oxidative stress-induced senescence and apoptosis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1877–1884.

Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V. et al. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular Cell Biology*, 25, 9543–9553.

Perruche, S., Zhang, P., Liu, Y., Saas, P., Bluestone, J.A., Chen, W. (2008). CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor- $\beta$  from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nature Medicine*, 14, 528–535.

Pessina, A., Bonomi, A., Coccè, V., Invernici, G., Navone, S., Cavicchini, L. et al. (2011). Mesenchymal stromal cells primed with paclitaxel provide a new approach for cancer therapy. *PLoS ONE*, 6, e28321.

Plumas, J., Chaperot, L., Richard, M.-J., Molens, J.-P., Bensa, J.-C., Favrot, M.-C. (2005). Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia*, 19, 1597–1604.

\*Pobezinskaya, Y.L., Liu, Z. (2012). The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle*, 11, 871–876.

- \*Proskuryakov, S.Y. a, Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*, 283, 1–16.
- Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F. et al. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: A model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*, 26, 151–162.
- Ramasamy, R., Lam, E.W.-F., Soeiro, I., Tisato, V., Bonnet, D., Dazzi, F. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on *in vivo* tumor growth. *Leukemia*, 21, 304–310.
- Reinhardt, J., Landsberg, J., Schmid-Burgk, J.L., Ramis, B.B., Bald, T., Glodde, N. et al. (2017). MAPK signaling and inflammation link melanoma phenotype switching to induction of CD73 during immunotherapy. *Cancer Research*, 77, 4697–4709.
- Rosado, M.M., Bernardo, M.E., Scarsella, M., Conforti, A., Giorda, E., Biagini, S. et al. (2015). Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells*, 24, 93–103.
- Rui, J., Fang, S., Wang, Y., Lv, B., Yu, B., Li, S. (2018). Inhibition of microRNA-16 protects mesenchymal stem cells against apoptosis. *Molecular Medical Research*, 18, 902–910.
- Rüster, B., Göttig, S., Ludwig, R.J., Bistrrian, R., Müller, S., Seifried, E. et al. (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108, 3938–3944.
- Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M., Mahon, B.P. (2007). Interferon- $\gamma$  does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 149, 353–363.
- Sheard, M.A., Asgharzadeh, S., Liu, Y., Lin, T.-Y., Wu, H.-W., Ji, L. et al. (2013). Membrane-bound TRAIL supplements natural killer cell cytotoxicity against neuroblastoma cells. *Journal of Immunotherapy*, 36, 319–329.
- Simon, A.K., Williams, O., Mongkolsapaya, J., Jin, B., Xu, X.N., Walczak, H. et al. (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development: sensitivity of human thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 5158–5163.
- Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Baxevanis, C.N., Papamichail, M. (2006). Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24, 74–85.
- Spano, C., Grisendi, G., Golinelli, G., Rossignoli, F., Prapa, M., Bestagno, M. et al. (2019). Soluble TRAIL armed human MSC as gene therapy for pancreatic cancer. *Scientific Reports*, 9, 1788.
- Sugiyama-Nakagiri, Y., Fujimura, T., Moriwaki, S. (2016). Induction of skin-derived precursor cells from human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*, 11, e0168451.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K.A., Gage, F.H. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2<sup>+</sup> neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1, 515–528.
- Tabera, S., Pérez-Simón, J.A., Díez-Campelo, M., Sánchez-Abarca, L.I., Blanco, B., López, A. et al. (2008). The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*, 93, 1301–1309.
- Taimr, P., Higuchi, H., Kocova, E., Rippe, R.A., Friedman, S., Gores, G.J. (2003). Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology*, 37, 87–95.

- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663–676.
- Tang, Y.-M., Bao, W.-M., Yang, J.-H., Ma, L.-K., Yang, J., Xu, Y. et al. (2016). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells inhibit growth and promote apoptosis of HepG2 cells. *Molecular Medicine Reports*, 14, 2717–2724.
- Teo, G.S.L., Ankrum, J.A., Martinelli, R., Boetto, S.E., Simms, K., Sciuto, T.E., et al. (2012). Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells. *Stem Cells*, 30, 2472–2486.
- Tipnis, S., Viswanathan, C., Majumdar, A.S. (2010). Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunology & Cell Biology*, 88, 795–806.
- Trachana, V., Petrakis, S., Fotiadis, Z., Siska, E.K., Balis, V., Gonos, E.S. et al. (2017). Human mesenchymal stem cells with enhanced telomerase activity acquire resistance against oxidative stress-induced genomic damage. *Cytotherapy*, 19, 808–820.
- Wajant, H., Moosmayer, D., Wüest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schönherr, U. et al. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene*, 20, 4101–4106.
- Wang, G.-H., Liu, Y., Wu, X.-B., Lu, Y., Liu, J., Qin, Y.-R. et al. (2016). Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells combined with nimodipine against radiation-induced brain injury through inhibition of apoptosis. *Cytotherapy*, 18, 53–64.
- Wang, L., Qing, L., Liu, H., Liu, N., Qiao, J., Cui, C. et al. (2017). Mesenchymal stromal cells ameliorate oxidative stress-induced islet endothelium apoptosis and functional impairment via Wnt4- $\beta$ -catenin signaling. *Stem Cell Research & Therapy*, 8, 188.
- \*Waring, P., Müllbacher, A. (1999). Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunology & Cell Biology*, 77, 312–317.
- Wu, S., Ju, G.-Q., Du, T., Zhu, Y.-J., Liu, G.-H. (2013). Microvesicles derived from human umbilical cord wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 8, e61366.
- Xu, C., Xiao, G., Zhang, B., Wang, M., Wang, J., Liu, D. et al. (2018). CCAT1 stimulation of the symmetric division of NSCLC stem cells through activation of the Wnt signalling cascade. *Gene Therapy*, 25, 4–12.
- Xu, G., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, G., Shi, Y. (2007). The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, 745–750.
- Xu, H.T., Zhou, Y., Li, W., Zhang, H.H., Wu, H.Y., Yang, J. (2017). Effect of mesenchymal stem cells on the apoptosis of breast cancer cells induced by cisplatin. *Chinese Journal of Oncology*, 39, 566–572.
- Xu, J., Qian, J., Xie, X., Lin, L., Zou, Y., Fu, M. et al. (2012). High density lipoprotein protects mesenchymal stem cells from oxidative stress-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt pathway and suppression of reactive oxygen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 17104–17120.
- Yan, Z., Zhuansun, Y., Liu, G., Chen, R., Li, J., Ran, P. (2014). Mesenchymal stem cells suppress T cells by inducing apoptosis and through PD-1/B7-H1 interactions. *Immunology Letters*, 162, 248–255.
- Yeo, R.W.Y., Lai, R.C., Zhang, B., Tan, S.S., Yin, Y., Teh, B.J. et al. (2013). Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 336–341.

Yin, L., Huang, D., Liu, X., Wang, Y., Liu, J., Liu, F. et al. (2017). Omentin-1 effects on mesenchymal stem cells: proliferation, apoptosis, and angiogenesis in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 8, 224.

\*Young, R.A. (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell*, 144, 940–954.

Yuan, Z., Kolluri, K.K., Sage, E.K., Gowers, K.H.C., Janes, S.M. (2015). Mesenchymal stromal cell delivery of full-length tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is superior to soluble type for cancer therapy. *Cytotherapy*, 17, 885–896.

Yuan, Z., Kolluri, K.K., Gowers, K.H.C., Janes, S.M. (2017). TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6, 1265291.

Zhang, R., Chen, H., Zheng, Z., Liu, Q., Xu, L. (2015). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy for neurological disorders via inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway-mediated apoptosis. *Molecular Medicine Reports*, 11, 1807–1812.

Zhou, H., Li, X.M., Meinkoth, J., Pittman, R.N. (2000). Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *The Journal of Cell Biology*, 151, 483–494.

## **Seznam internetových zdrojů**

[www.creative-diagnostics.com](http://www.creative-diagnostics.com)

[www.eurostemcell.org](http://www.eurostemcell.org)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7070>